

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabriel Rocha Fernandes

Diversidade e posicionamento filogenético de ciliados (Ciliophora) do solo da Serra da Mantiqueira, Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais, Brasil

Juiz de Fora

2026

Gabriel Rocha Fernandes

Diversidade e posicionamento filogenético de ciliados (Ciliophora) do solo da Serra da Mantiqueira, Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais, Brasil

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mariana Fonseca Rossi

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Juiz de Fora

2026

Gabriel Rocha Fernandes

Diversidade e posicionamento filogenético de ciliados (Ciliophora) do solo da Serra da Mantiqueira, Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais, Brasil

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em (dia) de (mês) de (ano)

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Mariana Fonseca Rossi - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dra. Marta d'Agosto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Roberto de Oliveira Marchesini
Instituto Federal de Roraima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	METODOLOGIA	10
2.1	Coleta de amostras	10
2.2	Extração e sequenciamento	11
2.3	Controle de qualidade e processamento dos dados	12
2.4	Construção do banco de dados de referência e seleção de sequências	12
2.5	Alinhamento, seleção de modelo evolutivo e inferência filogenética.....	12
3	RESULTADOS	13
3.1	Processamento de Dados e Distribuição das ASVs	13
3.2	Posicionamento filogenético das ASVs	19
3.3	Caracterização Taxonômica e Posicionamento Filogenético das Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs)	19
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÕES	22
	REFERÊNCIAS	22

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiro lugar, que me conduziu por este caminho e por me conceder saúde, ao longo desses anos. Agradeço também por me dar forças e me manter firme no caminho que escolhi trilhar.

Ao meu pai, **Jaime** e minha avó **Terezinha**, pelo amor incondicional, pelo apoio financeiro e, principalmente, emocional ao longo da minha jornada acadêmica. Sem vocês nada disso seria possível.

À **Elisa**, minha namorada, pelos momentos de companheirismo. Sua dedicação, paciência e apoio constante contribuíram de maneira significativa para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. **Mariana Rossi**, pela oportunidade de me orientar na conclusão deste trabalho, agradeço pela paciência, confiança e dedicação. Suas aulas despertaram em mim o interesse pela área que hoje estudo, trabalho e amo, influenciando de maneira decisiva minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Professor Dr. **Roberto Júnio Pedroso Dias**, seu exemplo como docente e pesquisador foi fundamental para minha formação, contribuindo significativamente para meu crescimento acadêmico, científico e profissional.

A toda a equipe do Laboratório de Protozoologia- UFJF, **Elisa, Pedro, Mylena, Gabriella, Isadora e Dhenifer**, agradeço pelo convívio diário, pelas conversas descontraídas e principalmente pelo suporte para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço a **Mylena, Gabriella e Pedro**, que tornaram toda minha passagem por este local mais acessível e acolhedora, contribuindo significativamente para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

E à **Universidade** Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela disponibilização de todos os materiais necessários para a realização deste estudo.

Resumo

O filo Ciliophora desempenha funções essenciais no ciclo de nutrientes dos ecossistemas terrestres, mas a diversidade desses microrganismos em solos neotropicais ainda permanece pouco conhecida. Este estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente a comunidade de protistas ciliados residentes no solo da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Chapadão da Serra Negra por meio de sequenciamento de leitura longa utilizando a plataforma PacBio. A amostragem consistiu na coleta de serapilheira e solo superficial, seguindo protocolos de preservação *in situ*. O DNA genômico total foi extraído utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation, seguido da avaliação da qualidade e concentração do material. As bibliotecas foram preparadas para sequenciamento na plataforma PacBio Sequel II visando à obtenção de sequências completas do gene 18S rDNA. Os dados foram processados no programa QIIME2 utilizando o banco de referência PR2 e, após a atribuição taxonômica, as ASVs pertencentes ao filo Ciliophora foram selecionadas para análises filogenéticas. Posteriormente, foi construída uma árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança, contendo sequências de referência disponíveis no GenBank e as variantes de sequência exatas (ASVs) obtidas. Os resultados evidenciaram elevada diversidade de eucariotos nas amostras analisadas. Das 722 ASVs obtidas, 17 pertencentes ao filo Ciliophora distribuíram-se entre as classes Colpodea, Oligohymenophorea, Spirotrichea, Litostomatea e Phyllopharyngea. A classe Colpodea apresentou a maior abundância de ASVs. O sequenciamento de leitura longa proporcionou elevada resolução taxonômica, evidenciando uma biodiversidade oculta no solo e reforçando a importância da reserva como refúgio para a diversidade.

Palavras-chave: Ciliophora, PacBio, metataxonomia, diversidade molecular, filogenia.

Abstract

The phylum Ciliophora plays essential roles in nutrient cycling within terrestrial ecosystems, but the diversity of these microorganisms in Neotropical soils remains poorly understood. This study aimed to molecularly characterize the community of soil-dwelling ciliate protists from the Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Chapadão da Serra Negra using long-read sequencing on the PacBio platform. Sampling consisted of collecting leaf litter and surface soil following *in situ* preservation protocols. Total genomic DNA was extracted using the PowerSoil DNA Isolation Kit, followed by evaluation of DNA quality and concentration. Libraries were prepared for sequencing on the PacBio Sequel II platform to obtain full-length 18S rDNA sequences. The resulting data were processed using the QIIME2 pipeline with the PR2 reference database, and, following taxonomic assignment, the ASVs belonging to the phylum Ciliophora were selected for phylogenetic analyses. Subsequently, a phylogenetic tree was reconstructed using the Maximum Likelihood method, including reference sequences available in GenBank and the exact amplicon sequence variants (ASVs) obtained. The results revealed a high diversity of eukaryotes in the analyzed samples. Of the 722 ASVs obtained, 17 belonging to the phylum Ciliophora were distributed among the classes Colpodea, Oligohymenophorea, Spirotrichea, Litostomatea, and Phyllopharyngea. The class Colpodea showed the highest ASV abundance. Long-read sequencing provided high taxonomic resolution, revealing hidden soil biodiversity and reinforcing the importance of the reserve as a refuge for biodiversity.

Keywords: Ciliophora, PacBio, metataxonomy, soil diversity, phylogeny.

1.Introdução

O filo Ciliophora é composto por microrganismos eucariontes unicelulares heterotróficos, que apresentam como sinapomorfias o dimorfismo nuclear (macronúcleo e micronúcleo), a reprodução sexual por conjugação e uma infraciliatura complexa (Lynn, 2008). Os protozoários de vida livre são abundantes em diversos ambientes aquáticos e terrestres, ocorrendo tanto como organismos nadadores quanto associados a superfícies bióticas e abióticas, demonstrando grande capacidade de adaptação (Finlay & Esteban, 1998). Algumas espécies podem responder rapidamente a mudanças físico-químicas formando cistos resistentes, que funcionam como mecanismos de proteção e dispersão. Essa característica provavelmente explica sua ampla distribuição geográfica (Meshjel, 2024) e reforça sua utilidade no biomonitoramento em ecossistemas terrestres.

Nos ecossistemas terrestres, os ciliados compõem uma parcela importante da microbiota do solo e da rizosfera, participando ativamente da estruturação das comunidades microbianas e da ciclagem de nutrientes (Ekelund; Rønn, 1994). Nesse contexto, os protistas destacam-se como reguladores ecológicos fundamentais do microbioma rizosférico, desempenharam um papel importante na regulação indireta da microbiota da rizosfera. Sua atividade predatória, principalmente sobre bactérias, favorece processos relacionados à disponibilidade de nutrientes, ao desenvolvimento vegetal e à manutenção da saúde das plantas (Geisen et al., 2018; GAO et al., 2018). A ausência dessa atividade compromete o chamado "loop microbiano", reduzindo a velocidade da ciclagem de nutrientes e tornando indisponível parte do nitrogênio presente na biomassa bacteriana (Nicodemo, 2009). Estima-se que a predação da biomassa bacteriana realizada por protistas nos solos seja responsável pela remobilização constante de cerca de um terço do nitrogênio consumido na forma de amônia, especialmente na rizosfera das plantas (Geisen et al., 2019). Na ausência dessa atividade, o "loop" microbiano fica comprometido, levando a uma ciclagem mais lenta de nutrientes, uma vez que o nitrogênio contido na biomassa bacteriana torna-se inacessível ao sistema (Nicodemo, 2009).

O uso de ferramentas moleculares têm ampliado significativamente o conhecimento sobre a diversidade e a evolução dos ciliados (Gao et al., 2016). Entre essas ferramentas, o marcador molecular SSU 18S rDNA destaca-se como um dos mais utilizados em estudos filogenéticos e levantamentos de diversidade molecular. Sua presença em todos os eucariotos e a combinação de regiões conservadas e variáveis permitem reconstruções filogenéticas e a identificação de organismos em diferentes níveis taxonômicos (Pawlowski et al., 2012). O

desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, principalmente associado ao uso do gene 18S rDNA, tem possibilitado a caracterização da diversidade de ciliados diretamente a partir de amostras ambientais (Geisen et al., 2018). Essa abordagem elimina a necessidade de isolamento e cultivo dos organismos, etapas frequentemente difíceis ou inviáveis para muitas espécies de ciliados, além de reduzir a dependência de taxonomistas especializados para a identificação morfológica, um processo que demanda elevado conhecimento técnico e tempo. Como consequência, o sequenciamento ambiental permite detectar simultaneamente um número muito maior de táxons, incluindo organismos raros, de baixa abundância ou de difícil identificação, revelando uma parcela significativa da biodiversidade ainda não descrita e ampliando substancialmente o conhecimento sobre a composição e a distribuição desses organismos (Burki et al., 2021).

Embora avanços importantes tenham sido alcançados nas últimas décadas, o conhecimento sobre a diversidade de ciliados em ambientes terrestres ainda permanece incompleto, especialmente em regiões pouco amostradas (Costa et al., 2026). Grande parte dessa diversidade permanece desconhecida devido às limitações dos métodos tradicionais de identificação baseados exclusivamente em caracteres morfológicos (Geisen et al., 2017). Nesse contexto, estudos macroevolutivos recentes, como o de Costa et al. (2026), demonstram que, embora a colonização de ambientes terrestres tenha ocorrido independentemente em diversas linhagens de Ciliophora, as dinâmicas de diversificação desses organismos são complexas e influenciadas por múltiplos fatores, reforçando a necessidade de abordagens integrativas que utilizam ferramentas moleculares para mapear a história evolutiva e a ocupação de habitats pelo filo.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a diversidade de forma molecular de ciliados em amostras ambientais por meio de sequências do gene 18S rDNA obtidas por sequenciamento PacBio, e posicionar filogeneticamente as linhagens detectadas. Além disso, busca contribuir para o conhecimento da biodiversidade de ciliados do solo, identificando possíveis linhagens ainda não descritas e ampliando as informações disponíveis sobre a distribuição taxonômica do filo Ciliophora em ambientes terrestres.

2. Metodologia

2.1 Coleta de Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes da Reserva Particular do Patrimônio Natural Chapadão da Serra Negra (RPPN Chapadão da Serra Negra), localizada na Serra da Mantiqueira, em Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais ($21^{\circ}57'50.3''\text{S}$, $43^{\circ}48'01.3''\text{W}$) (Fig. 1). No total, foram obtidos três pontos de coleta em uma área de aproximadamente 100 metros. Para a amostragem, realizou-se a raspagem da serrapilheira do solo e, com o auxílio de uma pá, foi feita a abertura de um buraco com profundidade de 10 cm, de onde a terra foi coletada. As amostras de solo, provenientes dos 3 pontos de coleta, foram reunidas em uma única amostra composta, homogeneizadas e diluídas em água. Em seguida, o material foi fracionado e armazenado em alíquotas de 50 mL. O material corresponde a amostras de solo coletadas em abril de 2024.

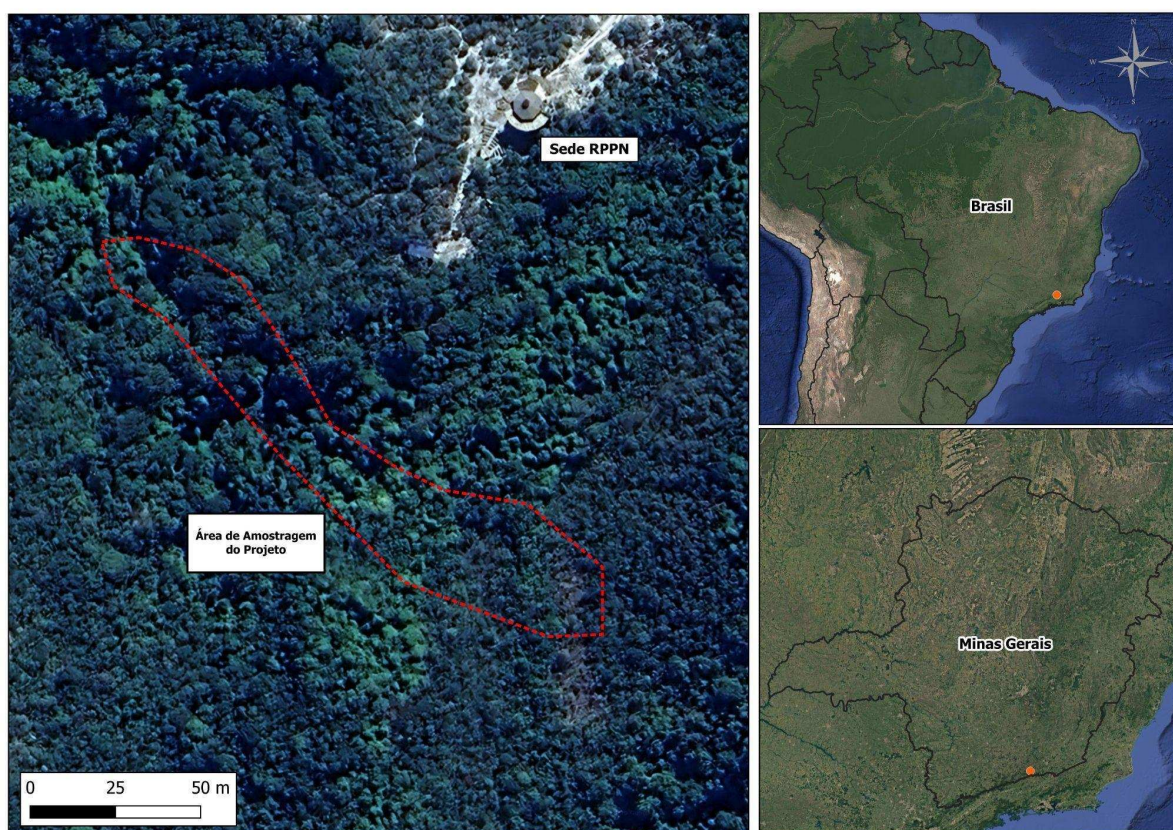


Figura 1 – Área de coleta na Reserva Particular do Patrimônio Natural Chapadão da Serra Negra (RPPN Chapadão da Serra Negra), em Santa Bárbara do Monte Verde, Minas Gerais. A área em vermelho destaca o local de amostragem na reserva, enquanto os mapas à direita indicam a localização da RPPN no estado de Minas Gerais e no Brasil.

2.2 Extração e sequenciamento

Posteriormente as amostras foram processadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), onde foi realizada a diluição do solo e, em seguida, a filtração do material por meio de filtros Sterivex™ de 0,22 µm e a extração de DNA genômico utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation (MoBIO Laboratories). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas em NanoDrop 2000, sendo as amostras com baixa concentração submetidas à secagem em SpeedVac DNA para concentração do material. Após essa etapa, as amostras foram encaminhadas para a empresa SENAI/CETIQT, no Rio de Janeiro, Brasil, para construção das bibliotecas e sequenciamento, utilizando a tecnologia PacBio Sequel II. Para os eucariotos, foram utilizados os primers EukA (AACCTGGTTGATCCTGCCAGT) e EukB (TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC) (Medlin et al., 1988), direcionados ao sequenciamento de fragmentos entre 1500 e 1800 pb do gene 18S rRNA. Após a preparação das bibliotecas SMRTbell, o sequenciamento de alta fidelidade (Hi-Fi reads) foi realizado em uma célula SMRT 8M, e a demultiplexação das sequências obtidas foi conduzida pelo software Lima (Pacific Biosciences, 2023).

2.3 Controle de qualidade e processamento dos dados

Dados brutos oriundos do sequenciamento PacBio passaram pela etapa de processamento e controle de qualidade no software QIIME2 (Bolyen et al., 2019). O pipeline foi adaptado para a análise das leituras do tipo Circular Consensus Sequencing (CCS) geradas pela plataforma PacBio (Rhoads e Au, 2015). Dessas, cerca de 30% das leituras CCS foram identificadas como quimeras e removidas do conjunto de dados. Em seguida, foi realizada a inferência das variantes de sequência de amplicons (ASVs), obtendo-se 721 ASVs. A atribuição taxonômica foi realizada pelo método Naive Bayes utilizando o banco de dados de referência PR2 versão 5.1.0 (Guillou et al., 2013). Posteriormente, os resultados da classificação taxonômica foram organizados em um arquivo de visualização, permitindo a inspeção das classificações atribuídas às ASVs em seus respectivos níveis taxonômicos. A partir dessa etapa, foi realizada a triagem das ASVs identificadas, mantendo-se apenas aquelas pertencentes ao filo Ciliophora, resultando em um conjunto final de 17 ASVs utilizadas nas análises subsequentes.

2.4 Construção do banco de dados de referência

Sequências disponíveis no banco de dados público GenBank (BENSON et al., 2013) do gene 18S rDNA de representantes do Filo Ciliophora foram obtidas para a montagem do *dataset* de referência. Para isso, uma busca foi realizada utilizando a expressão *booleana* "txid5878[Organism] AND ((Small[All Fields] AND subunit[All Fields]) OR 18S[All Fields]) AND (is_nucline[filter] AND ("1000"[SLEN] : "3000"[SLEN]))", a qual restringe os resultados a registros com tamanho entre 1.000 e 3.000 pares de bases pertencentes ao táxon Ciliophora. Os dados passaram então por uma etapa de triagem inicial, excluindo todas as sequências que não foram identificadas até o nível de espécie e que não utilizavam o marcador 18S rDNA como marcador genético. Após esse filtro, selecionou-se uma sequência representativa para cada espécie (Benson et al., 2013), totalizando 1792 sequências. Como grupos externos, foram utilizadas as espécies *Perkinsus marinus* AF324218.1, *Theileria parva* HQ895985.1, *Eimeria tenella* KT184354.1, *Toxoplasma gondii* L24381.1, *Karenia brevis* EF492504.1 e *Alexandrium tamarense* AJ535391.1, conforme proposto por Costa et al. (2021).

2.5 Alinhamento, seleção de modelo evolutivo e inferência filogenética

As ASVs obtidas no presente estudo foram então reunidas ao banco de dados de referência, realizando o alinhamento utilizando o software **MAFFT v.7.0** (Katoh et al., 2019), com os parâmetros padrões. Em seguida, o alinhamento foi editado no software GBlocks versão 1.0 para remover sítios mal alinhados, resultando em uma matriz final composta por 1.879 táxons e 1.510 pares de bases. A seleção do modelo evolutivo mais adequado para a inferência filogenética foi realizada utilizando o software IQ-TREE 3 e o módulo ModelFinder, sendo o modelo de melhor selecionado com base no critério de informação adotado pelo programa, o modelo GTR+F+R8. A árvore filogenética de máxima-verossimilhança (ML) e a estimativa do suporte estatístico dos nós por meio dos testes SH-aLRT e Ultrafast Bootstrap foram inferidos utilizando o software IQ-TREE 3.

3 Resultados

3.1 Processamento de Dados e Distribuição das ASVs

A partir do sequenciamento de leitura longa (PacBio Sequel II) de amostras ambientais da RPPN Chapadão da Serra Negra, o pipeline de bioinformática no software QIIME2 gerou um total de 722 ASVs. A atribuição taxonômica com o banco de dados PR2 revelou uma comunidade eucariótica diversa, composta por representantes dos filos Apicomplexa, Cercozoa, Chlorophyta, Ciliophora, Dinoflagellata, Euglenozoa e Streptophyta. Dentre essas ASVs, 17 foram classificadas como pertencentes ao filo Ciliophora (PR2 versão 5.1.0) e selecionadas para as análises subsequentes(fig.2).

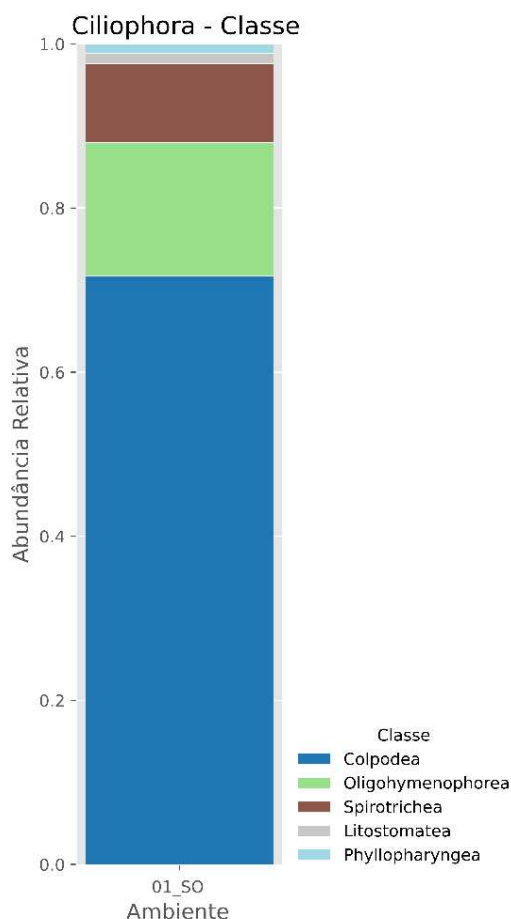


Figura 2 – Gráfico de barra da abundância relativa das ASVs pertencentes ao filo Ciliophora, Distribuição das ASVs em nível taxonômico de Classe.

3.2 Atribuição e Resolução Taxonômica

A atribuição taxonômica das ASVs foi realizada pelo classificador Naive Bayes implementado no QIIME2, utilizando o banco de dados de referência PR2 versão 5.1.0. A

análise demonstrou elevada confiança na classificação dos níveis taxonômicos mais inclusivos, especialmente até o nível de ordem. Em contrapartida, observou-se redução da resolução taxonômica nos níveis de família, gênero e espécie para parte das ASVs. A identificação no nível de espécie foi alcançada com alta resolução e confiança nas seguintes linhagens: ASV_1, ASV_2 e ASV_3 as quais foram identificadas como *Pseudoplatyophrya nana* (Classe Colpodea); as linhagens ASV_8 e ASV_16, as quais foram associadas à espécie *Platyophrya vorax* (Classe Colpodea); e a ASV_12, a qual foi mapeada como *Campanella umbellaria* (Classe Oligohymenophorea). Apenas uma linhagem teve a identificação no nível de gênero: ASV_10, a qual foi atribuída ao gênero *Vorticella* (Classe Oligohymenophorea).

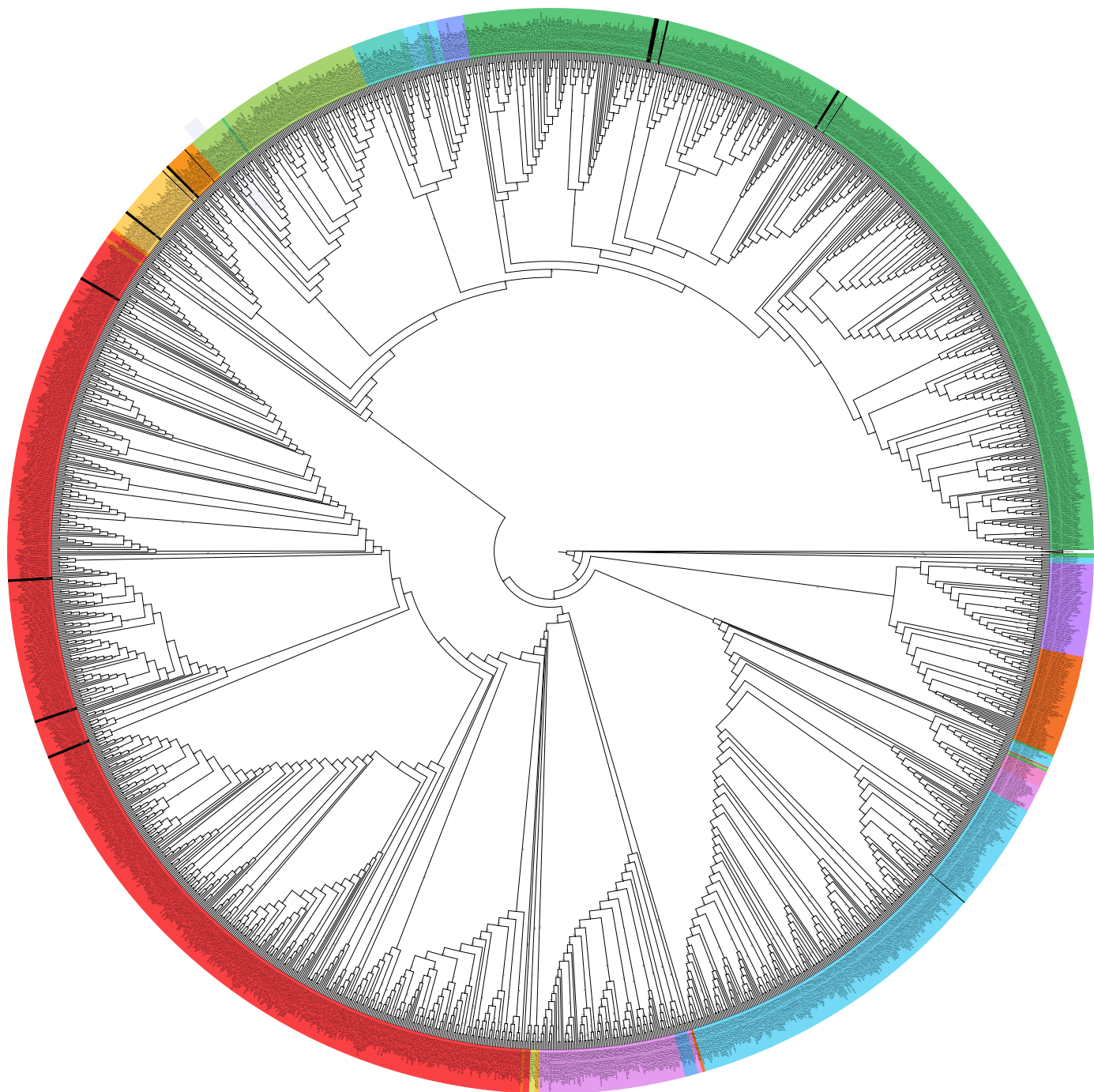
Diversas ASVs demonstraram lacunas de identidade nos níveis taxonômicos terminais, evidenciado pela não identificação dessas sequências, sugerindo a presença de táxons ainda não descritos no banco de dados de referência ou novos registros para a localidade. As ASV_7, ASV_14, ASV_15 e ASV_17, pertencentes à classe Spirotrichea (Ordem Hypotrichia), não obtiveram classificação além do nível de Ordem. De maneira semelhante, a ASV_6 (Classe Phyllopharyngea, Ordem Synhymenia) permaneceu sem identificação a nível de Gênero e Espécie, assim como as ASV_4, ASV_5 e ASV_13 dentro de Oligohymenophorea.

Tabela 1 – Resultados do pipeline QIIME2: assinatura taxonômica e abundância das ASVs do filo Ciliophora identificadas nas amostras de solo (o símbolo “-” indica ausência de assinatura no respectivo nível).

Código	Abundância	Filo	Subfilo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV_1	27	Alveolata	Ciliophora	Colpodea	Grossglockneriida	Grossglockneriidae	<i>Pseudoplatyophrya</i>	<i>P. nana</i>
ASV_2	9	Alveolata	Ciliophora	Colpodea	Colpodida	Grossglockneriidae	<i>Pseudoplatyophrya</i>	<i>P. nana</i>
ASV_3	4	Alveolata	Ciliophora	Colpodea	Colpodida	-	-	-
ASV_4	3	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	-	-	-
ASV_5	2	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	Operculariidae	-	-
ASV_6	2	Alveolata	Ciliophora	Phyllopharyngea	Synhymenia	Orthodonellidae	-	-
ASV_7	2	Alveolata	Ciliophora	Spirotrichea	Hypotrichia	Oxytrichidae	-	-
ASV_8	77	Alveolata	Ciliophora	Colpodea	Cyrtolophosidida	Platyophryidae	<i>Platyophrya</i>	<i>P. vorax</i>
ASV_9	2	Alveolata	Ciliophora	Litostomatea	Pleurostomatida	-	-	-
ASV_10	10	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	<i>Vorticellidae</i>	<i>Vorticella</i>	-
ASV_11	5	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	-	-	-
ASV_12	4	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	Epistylidae	<i>Campanella</i>	<i>C. umbellaria</i>
ASV_13	3	Alveolata	Ciliophora	Oligohymenophorea	Sessilida	-	-	-

Código	Abundância	Filo	Subfilo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV_14	8	Alveolata	Ciliophora	Spirotrichea	Hypotrichia	-	-	-
ASV_15	4	Alveolata	Ciliophora	Spirotrichea	Hypotrichia	-		-
ASV_16	2	Alveolata	Ciliophora	Colpodea	Colpodida	Platyophryidae	<i>Platyophrya</i>	<i>P. vorax</i>
ASV_17	2	Alveolata	Ciliophora	Spirotrichea	Hypotrichia	-	-	-

Nota: O símbolo "-" significa que não foi possível atribuir uma classificação taxonômica à linhagem naquele nível hierárquico através da metodologia empregada.



- | | |
|-------------------|-----------------|
| ASV | Litostomatea |
| Spirotrichea | Odontostomatea |
| Heterotrichea | Plagiopylea |
| Nassophorea | Karyorelictea |
| Colpodea | Colpodea |
| Phyllopharyngea | Armophorea |
| Oligohymenophorea | Muranotrichea |
| Prostomatea | Parablepharisma |
| Outgroup | |

Figura 3 – Árvore filogenética circular baseada em sequências do gene 18S rDNA de representantes do filo Ciliophora, reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança. A árvore inclui as ASVs obtidas neste estudo e sequências de referência utilizadas para sua classificação taxonômica. O arco externo em cinza representa o filo Ciliophora, enquanto as marcações em preto evidenciam o posicionamento das ASVs.

As ASVs apresentaram diferentes frequências de abundância, destacando-se a ASV_8 (classe Colpodea) com a maior representatividade quantitativa (77 leituras), seguida pela ASV_1 (espécie *Pseudoplatyophrya nana*) (27 leituras) e pela ASV_10 (Gênero *Vorticella*) (10 leituras).

3.3 Posicionamento filogenético das ASVs

A reconstrução filogenética por Máxima Verossimilhança (ML), fundamentada no alinhamento de sequências longas do gene 18S rDNA (~1500 a 1800 pb) obtidas via tecnologia PacBio, resultou em uma topologia robusta com suporte elevado de bootstrap para a comunidade de ciliados edáficos da RPPN Chapadão da Serra Negra (Fig.3).

A topologia da árvore filogenética conseguiu recuperar todas as classes, ordens, famílias e gêneros do filo Ciliophora, com elevado valor de suporte, validando o arranjo e as atribuições taxonômicas. A reconstrução filogenética por Máxima Verossimilhança (ML), fundamentada no alinhamento de sequências longas do gene 18S rDNA (~1500 a 1800 pb) obtidas via tecnologia PacBio, resultou em uma topologia robusta com suporte elevado de bootstrap para a comunidade de ciliados edáficos da RPPN Chapadão da Serra Negra (Fig. 3). A topologia da árvore filogenética recuperou todas as classes, ordens, famílias e gêneros representados no conjunto de dados, com elevados valores de suporte, corroborando as atribuições taxonômicas. As 17 ASVs obtidas neste estudo foram posicionadas em diferentes clados do filo Ciliophora, abrangendo as classes Colpodea, Oligohymenophorea, Spirotrichea, Litostomatea e Phyllopharyngea, sendo recuperadas como grupos-irmãos de espécies, gêneros ou famílias de referência, conforme o nível de resolução taxonômica alcançado para cada sequência.

Contudo, a comparação entre a atribuição taxonômica preliminar e a topologia obtida na inferência filogenética revelou um incremento significativo na resolução de classificação das linhagens edáficas. Antes da reconstrução da árvore filogenética, a análise metataxonômica automatizada via classificador Naive Bayes havia alcançado o nível específico para apenas 3 espécies, cujas distribuições de leituras e frequências encontram-se

detalhadas na Tabela 1: a linhagem ASV_1 e a ASV_2, identificadas como *Pseudoplatyophrya nana* (Classe Colpodea); as linhagens ASV_8 e ASV_16, associadas a *Platyophrya vorax* (Classe Colpodea); e a linhagem ASV_12, mapeada como *Campanella umbellaria* (Classe Oligohymenophorea).

Contudo, a inserção das sequências ambientais no dataset de referência e a subsequente análise de Máxima Verossimilhança permitiram refinar o posicionamento e expandir o diagnóstico taxonômico através das relações de parentesco na árvore (Tabela 2). Por meio deste refinamento filogenético, foi possível delimitar o posicionamento no nível de Espécie para um número maior de táxons, revelando o parentesco direto (Grupo-Irmão) de linhagens que antes careciam de resolução terminal. O método posicionou com robustez as variantes ambientais junto a 4 espécies de referência: *Pseudoplatyophrya nana* (como grupo-irmão das sequências ASV_1 e ASV_2, com 100% de suporte); *Oxytricha granulifera* (grupo-irmão da ASV_7, com 87% de suporte); *Oxytricha saltans* (grupo-irmão da ASV_15, com 94% de suporte); e *Anteholosticha sigmoidea* (grupo-irmão da ASV_17, com suporte máximo de 100%).

Adicionalmente, este trabalho contribuiu de forma expressiva para o mapeamento da biodiversidade microscópica regional ao acrescentar 17 novas linhagens (ASVs) inéditas ao cenário de estudos de ciliados edáficos da Serra da Mantiqueira. A inclusão dessas 17 variantes genéticas exatas amplia substancialmente os registros moleculares para a localidade, fornecendo subsídios para mitigar as lacunas geográficas e taxonômicas em bancos de dados públicos e evidenciando o papel da RPPN Chapadão da Serra Negra como um importante refúgio evolutivo para o filo Ciliophora.

Tabela 2 – Valores de suporte de *Bootstrap* (%) e posicionamento filogenético (GI - Grupo-Irmão) das Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs) de Ciliophora obtidas de amostras de solo da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais.

Código	Posicionamento filogenético	Suporte (%)
Asv_1	GI <i>Pseudoplatyophrya nana</i>	100
Asv_2	GI <i>Pseudoplatyophrya nana</i>	100
Asv_3	GI Grossglockneriidae	69
Asv_4	GI <i>Campanella</i>	100
Asv_5	GI <i>Opercularia</i>	100
Asv_6	GI Nassulopsidae + Orthodonellidae + Scaphidiodontidae	50
Asv_7	GI <i>Oxytricha granulifera</i>	87
Asv_8	GI <i>Platyophrya</i>	98
Asv_9	GI Amphileptidae + Litonotidae	
Asv_10	GI <i>Epicarchesium sinense</i> + <i>Epicarchesium granulatatum</i>	82
Asv_11	Sessilida	97
Asv_12	GI <i>Campanella</i>	69
Asv_13	GI Apocarchesium	100
Asv_14	GI Urostylidae + Hemicycliostylidae + Bakuellidae + Holostichidae	57
Asv_15	GI <i>Oxytricha saltans</i>	94
Asv_16	GI <i>Platyophrya</i>	87
Asv_17	Gi <i>Anteholosticha sigmoidea</i>	100

A análise taxonômica de sequenciamento revelou a presença de 17 Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs), todas pertencentes ao domínio Eukaryota, supergrupo

TSAR, filo Alveolata e subfilo Ciliophora. A diversidade recuperada distribui-se em diferentes classes e ordens, com o posicionamento filogenético estabelecido como grupo irmão de diferentes clados, suportado por análises de *bootstrap*.

Dentre os representantes da classe Colpodea, as sequências correspondentes às **ASV_1** e **ASV_2** (família Grossglockneriidae) posicionam-se como grupo irmão de *Pseudoplatyophrya nana* na árvore filogenética, apresentando suporte máximo de *bootstrap* (100%). A **ASV_3**, também afiliada à ordem Colpodida, posiciona-se como grupo irmão de Grossglockneriidae, com suporte igualmente robusto (100%). Ainda nessa classe, as sequências **ASV_8** e **ASV_16** foram identificadas até o nível de espécie como *Platyophrya vorax*, posicionando-se de forma consistente como grupo irmão de *Platyophrya*, com suporte de 87%.

A Classe Oligohymenophorea, inteiramente representada pela Ordem Sessilida neste conjunto de dados, demonstrou variação no nível de resolução de seus clados. A **ASV_4** posiciona-se como grupo irmão de *Campanella*, apresentando suporte de 69%, um padrão de posicionamento e robustez idêntico ao observado para a **ASV_12**, a qual obteve identificação em nível específico como *Campanella umbellaria*. A **ASV_5**, pertencente à família Operculariidae, posiciona-se de forma inequívoca como grupo irmão de *Opercularia*, com 100% de suporte. A **ASV_10**, classificada no gênero *Vorticella*, constitui-se como grupo irmão do clado formado por *Epicarchesium sinense* e *Epicarchesium granulatum*, com suporte de 82%. Adicionalmente, a **ASV_13** posiciona-se como grupo irmão de *Apocarchesium* (100% de suporte), ao passo que a **ASV_11** posiciona-se como grupo irmão de Sessilida com robustez de 97%, sem resolução obtida em níveis taxonômicos inferiores.

Os clados da Classe Spirotrichea, todos pertencentes à Ordem Hypotrichia, revelaram diferentes topologias. A **ASV_7** posiciona-se como grupo irmão de *Oxytricha granulifera*, com suporte de 50%, enquanto a **ASV_15** posiciona-se como grupo irmão de *Oxytricha saltans*, demonstrando suporte superior de 94%. A **ASV_14** apresentou um posicionamento filogenético como grupo irmão do clado que engloba as famílias Urostylidae, Hemicyclostylidae, Bakuellidae e Holostichidae, sob suporte de 57%. Já a **ASV_17** demonstrou posicionamento como grupo irmão de *Anteholosticha sigmoidea*, com máxima robustez (100%).

Por fim, linhagens pertencentes a outras classes menos representadas também foram recuperadas. A **ASV_6**, representante da classe Phyllopharyngea (ordem Synhymenia), posiciona-se como grupo irmão do clado que abrange as famílias Nassulopsidae,

Orthodonellidae e Scaphidiodontidae, com suporte de 100% de *bootstrap*. A **ASV_9**, única sequência representante da classe Litostomatea (ordem Pleurostomatida), demonstrou posicionamento como grupo irmão do clado composto pelas famílias Amphileptidae e Litonotidae, com suporte de 98%.

4. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo revelam uma comunidade de ciliados rica e diversa no solo da RPPN Chapadão da Serra Negra. A identificação de diferentes classes e a indicação de linhagens desconhecidas confirmam a importância de estudar áreas preservadas, como a Serra da Mantiqueira, para entender melhor a biodiversidade de microrganismos terrestres. Os dados moleculares ajudam a explicar como esses seres vivos se organizam e realizam funções importantes no ecossistema edáfico.

A utilização do sequenciamento de longa leitura por PacBio se demonstrou fundamental para o sucesso deste inventário. Ao contrário das plataformas tradicionais que geram apenas fragmentos curtos de DNA, o sequenciamento do gene 18S rDNA quase completo permitiu uma análise mais acurada. Essa abordagem contribuiu para uma assinatura taxonômica mais profunda das linhagens encontradas, ajudando ainda em um posicionamento filogenético mais suportado na árvore filogenética.

O predomínio da classe Colpodea, evidenciado não apenas pelo número de ASVs, mas também pela elevada abundância das variantes ASV_8 e ASV_16 (identificadas como *Platyophrya vorax*), corrobora o perfil adaptativo destes organismos. Espécies desta classe são frequentemente descritas como pioneiras e estrategistas *r*, altamente adaptadas a flutuações de umidade e nutrientes típicas de ambientes edáficos (Foisnner, 1990). A presença expressiva de *Pseudoplatyophrya nana* (ASV_1 e ASV_2) também reforça a importância desses ciliados na regulação das teias tróficas locais, onde atuam ativamente como consumidores de bactérias e fungos, dinamizando a ciclagem de nutrientes na serrapilheira. (Geisen et al., 2016 e Murase et al., 2006)

Um dos achados mais notáveis desta pesquisa, corroborado pela análise minuciosa da árvore filogenética, é a presença de longos ramos isolados, especialmente dentro da ordem Hypotrichia, na classe Spirotrichea. As variantes ASV_7, ASV_14, ASV_15 e ASV_17 não obtiveram classificação além do nível de ordem ou apresentaram lacunas de identidade nos níveis terminais taxonômicos. Esse padrão, nitidamente visualizado na topologia da árvore de Máxima Verossimilhança, é um forte indicativo da presença de linhagens neotropicais novas e ainda não descritas pela ciência. A dificuldade de atribuição taxonômica em níveis específicos reflete as lacunas ainda existentes nos bancos de dados genéticos públicos (como o PR2 e o GenBank), que historicamente concentram sequências de organismos de regiões temperadas, subestimando a real biodiversidade microscópica dos solos da Serra da Mantiqueira e de outros ecossistemas neotropicais. Esses resultados reforçam a importância

da ampliação de estudos na RPPN Chapadão da Serra Negra e em outras áreas preservadas da Serra da Mantiqueira, contribuindo para o aumento da representatividade dessas linhagens nos bancos de dados de referência. Além disso, evidenciam a necessidade do desenvolvimento e da aplicação de algoritmos de classificação taxonômica mais sensíveis às diferenças intraespecíficas, capazes de aprimorar a delimitação de espécies e revelar a diversidade ainda oculta desses organismos.

Além disso, a detecção de representantes da classe Oligohymenophorea, particularmente da Ordem Sessilida (com táxons afiliados aos gêneros *Vorticella*, *Campanella* e *Opercularia*), sugere a existência de micro-habitats com retenção de umidade no solo da RPPN Chapadão da Serra Negra. Embora muitos peritríquios sejam primariamente associados a corpos d'água, sua presença no solo e na serrapilheira indica que os finos biofilmes de água formados ao redor das partículas de terra fornecem condições propícias para o estabelecimento de ciliados filtradores. Estes organismos dependem de uma fase aquosa para expandir sua coroa ciliar e forragear, o que evidencia a complexidade microclimática e a boa preservação do ambiente amostrado.

A diversidade taxonômica da comunidade também é complementada pela recuperação de linhagens das classes Phyllopharyngea e Litostomatea, que aponta para uma estruturação trófica madura. A variante ASV_9, representante da ordem Pleurostomatida (Litostomatea), agrupa-se com famílias tipicamente compostas por predadores carnívoros que se alimentam de outros ciliados e flagelados. A presença de predadores de topo no nível microbiano confirma que a teia alimentar do solo local é ativa e ecologicamente balanceada. Essa intensa predação realizada por protistas é o motor do "loop microbiano", um processo ecológico crucial responsável por acelerar a ciclagem de nutrientes e liberar frações significativas de nitrogênio que, de outra forma, permaneceriam imobilizadas na biomassa bacteriana.

Do ponto de vista metodológico, a validação do posicionamento filogenético com altos valores de suporte (como os 100% de *bootstrap* observados nos clados de *Pseudoplatyophrya*, *Opercularia* e *Apocarchesium*) reafirma que o uso de fragmentos longos do 18S rDNA gerados pela plataforma PacBio supera significativamente as limitações inerentes aos métodos convencionais de sequenciamento de fragmentos curtos. A árvore filogenética gerada demonstra resolução nas ramificações profundas, permitindo ancorar com segurança as ASVs ambientais aos grupos de referência conhecidos.

5. Conclusão

A avaliação metataxonômica baseada no sequenciamento de fragmentos longos (PacBio) revelou que a comunidade de ciliados edáficos da RPPN Chapadão da Serra Negra é altamente diversa, troficamente estruturada e abriga linhagens evolutivas singulares. O ecossistema microscópico local é dominado por estrategistas *r* adaptados às oscilações do solo, mas sustenta igualmente uma teia complexa que inclui desde organismos filtradores, indicadores da retenção de micro-habitats úmidos, até predadores de topo cruciais para o funcionamento do "loop microbiano".

A detecção de longos ramos filogenéticos isolados, particularmente na classe Spirotrichea, constitui uma evidência robusta de que os solos neotropicais de altitude abrigam uma diversidade oculta significativa, com táxons que ainda não possuem representação nos bancos de dados genéticos globais. Embora a metataxonomia de fragmentos longos tenha se mostrado uma ferramenta excepcional para contornar essa invisibilidade e desvendar a arquitetura filogenética da comunidade, ressalta-se que trabalhos futuros deverão aliar abordagens moleculares a esforços de cultivo isolado e caracterização morfológica para viabilizar a descrição formal dessas novas espécies.

Em suma, os dados moleculares e evolutivos aqui apresentados evidenciam de maneira contundente que o solo da RPPN Chapadão da Serra Negra atua como um inestimável refúgio de vida microscópica. A revelação de uma comunidade microbiana tão complexa e potencialmente endêmica ressalta a urgência da manutenção integral dos remanescentes florestais da Serra da Mantiqueira. A preservação destas áreas transcende a tradicional proteção da macrofauna e flora, sendo vital para resguardar um vasto, ativo e ainda inexplorado patrimônio genético e funcional de microrganismos terrestres.

Referencias

- BURKI, Fabien; SANDIN, Miguel M.; JAMY, Mahwash. Diversity and ecology of protists revealed by metabarcoding. *Current Biology*, [s. l.], v. 31, n. 19, p. R1267-R1280, 11 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.066>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- BENSON, Dennis A.; CAVANAUGH, Mark; CLARK, Karen *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36–D42, 2013. DOI:<https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>.
- COSTA, Fabiola da Silva; DIAS, Roberto Júnio Pedroso; ROSSI, Mariana Fonseca. Macroevolutionary analyses of ciliates associated with hosts support high diversification rates. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 51, n. 11, p. 967-976, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.03.003>. Acesso em: 10 jul. 2026.
- COSTA, Fabiola da Silva; OUVÉNEY JÚNIOR, Wellington Luiz; DIAS, Roberto Júnio Pedroso; ROSSI, Mariana Fonseca. Analysis of the impact of terrestrial habitats on the evolutionary dynamics in the phylum Ciliophora. **Biological Journal of the Linnean Society**, [S. l.], v. 148, n. 1, blag023, maio 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blag023>. Acesso em: 10 jul. 2026.
- FINLAY, Bland J.; ESTEBAN, Genoveva F. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. **Biodiversity & Conservation**, v. 7, n. 9, p. 1163-1186, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008879616066>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- FOISSNER, W. *Kuehneliella terricola* gen. nov., sp. nov., a carnivorous ciliate (Protozoa, Ciliophora) from a sandy soil in Australia. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, n. 2, p. 110–118, 1990.
- GAO, Feng *et al.* The All-Data-Based Evolutionary Hypothesis of Ciliated Protists with a Revised Classification of the Phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). *Scientific Reports*, [s. l.], v. 6, n. 24874, p. 1-4, 29 abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep24874>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- GAO, Zheng; EDWARDS, Jeremy; CHOI, Jae-Hyuk; MEI, Chuansheng; HU, Yi. Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 2, p. 165-176, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.011>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- GEISEN, Stefan; MITCHELL, Edward A. D.; ADL, Sina *et al.* Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 3, p. 293–323, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy006>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- GUILLOU, Laure; BACHAR, Denis; AUDIC, Stéphane *et al.* The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D597–D604, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>. Acesso em: 6 jul. 2026.
- KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, Oxford, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>. Acesso em: 10 jul. 2026.
- LYNN, Denis H. **The ciliated Protozoa**: characterization, classification, and guide to the literature. 3. ed. New York: Springer, 2008.

MESHJEL, Maysoon. Diversity of Free-Living Protozoa. **Wasit Journal for Pure Sciences**, v. 3, n. 2, p. 238–258, 2024. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/381907835_Diversity_of_Free-Living_Protozoa. Acesso em: 6 jul. 2026.

MURASE, Jun; NOLL, Matthias; FRENZEL, Peter. Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5436-5444, Aug. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00207-06>.

NICODEMO, Maria Luiza Franceschi. **1ª capa**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. 1 imagem, color. Capa da publicação: Uso de biomassa microbiana para avaliação de qualidade do solo em sistemas silvipastoris (Documentos, 93). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/696813/1/PROCIDoc93MLFN2009.00411.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2026

PAWLOWSKI, Jan et al. CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology*, [S. l.], v. 10, n. 11, e1001419, 6 nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>. Acesso em: 10 jul. 2026.

RHOADS, Anthony; AU, Kin Fai. PacBio Sequencing and its Applications. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 278–289, Oct. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>. Acesso em: 6 jul. 2026.